

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659512

研究課題名（和文）

モヤモヤ病発症リスクの評価を可能にする遺伝子診断法の開発

研究課題名（英文）

Development of a genetic test to evaluate the risk for Moyamoya disease

研究代表者

呉 繁夫 (KURE SHIGEO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10205221

研究成果の概要（和文）：

モヤモヤ病は、両側内頸動脈の閉塞・狭窄と無数の毛細血管新生を特徴とする。私どもは、全ゲノム相関解析により疾患感受性遺伝子 RNF213 を同定した。今回、RNF213 遺伝子の日本人高頻度遺伝子変異の簡便な検出法を確立した。遺伝子変異検出には、以前開発した CASSOH (competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization) 法を用いた。本法は、外来やベッドサイドにおいて迅速・簡便な発症リスク診断を可能にする。

研究成果の概要（英文）：

Moyamoya disease (MMD) shows progressive cerebral angiopathy characterized by bilateral internal carotid artery stenosis and abnormal collateral vessels. A genome-wide association study was performed, which resulted in a strong association of chromosome 17q25-ter with MMD risk. A single haplotype consisting of seven SNPs at the RNF213 locus was tightly associated with MMD ( $P=5.3 \times 10^{-10}$ ). Mutational analysis of RNF213 revealed a founder mutation, p. R4859K, in 73% of non-familial MMD cases and 1.4% of controls; this mutation greatly increases the risk of MMD ( $P=1.2 \times 10^{-43}$ , odds ratio=190.8). We developed a genetic testing method for this founder mutation by using CASSOH (competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization). The CASSOH method enables us to detect the target mutation with immunochromatography without expertise, which would be useful for evaluation of a risk for MMD risk in bedside and clinic.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：モヤモヤ病、発症機序、遺伝子検査

## 1. 研究開始当初の背景

モヤモヤ病（MMD）は両側ウイリス動脈輪の閉塞と異常側副血管新生による脳虚血・出血を特徴とする疾患である。我が国では、慢性特定疾患に指定され、現在薬 13000 人の患者登録がなされている。発症ピークは、5 歳と 40 歳前後にあり、薬半数は小児期発症である。小児期においては、動脈硬化などによる脳卒中は珍しいため、MMD は小児脳卒中の主因となっている。

発症には、一過性脳虚血発作（TIA）で発症する症例が多く、次いで脳梗塞による発症が多い。TIA による発症に比べ、脳出血発症後の予後は悪い。最近、浅側頭動脈と中大脳動脈とのバイパス手術による早期介入で治療予後が改善する事が示されている。現在のところ、発症予知の方法は無いため、発症リスクの高い個体を見出し、MRI 検査と早期バイパス手術による介入を可能にする、スクリーニング法の開発が望まれる。

最近、申請者らは全ゲノム相関研究を行い MMD 感受性領域を同定した。その中で 17 番染色体領域から、MMD 感受性遺伝子 RNF213 を同定し、その遺伝子内に MMD 患者の 73% が持つ創始者変異を見出した。この変異により MMD 発症リスクが 190 倍に上昇するため、MMD リスク診断が可能となり、特許出願した（特願 2009-113706 「遺伝子検出によるモヤモヤ病発症リスク診断又は診断法」）。

## 2. 研究の目的

MMD 患者の全ゲノム相関研究で見いだした疾患感受性遺伝子 RNF213 内に存在する日本人高頻度遺伝子変異 p. R4856K の有無を迅速・簡便に検出する遺伝子検査法の開発を行い、MMD 発症リスクの正確な評価を可能にすることを目的にする。

## 3. 研究の方法

遺伝子変異の検出には、申請者らが以前開発した CASSOH 法（特願 2002-323419 「遺伝子変異検出法」）を利用する。CASSOH 法は、オリゴヌクレオチド・プローブの競合的な結合を利用して、点変異の有無を検出する変異検出法である（図 1）。PCR による変異部分を含む遺伝子断片を増幅後、その反応液をイムノクロマト紙に滴下することで、遺伝子変異の有無を検出出来るため、非常に簡便である。

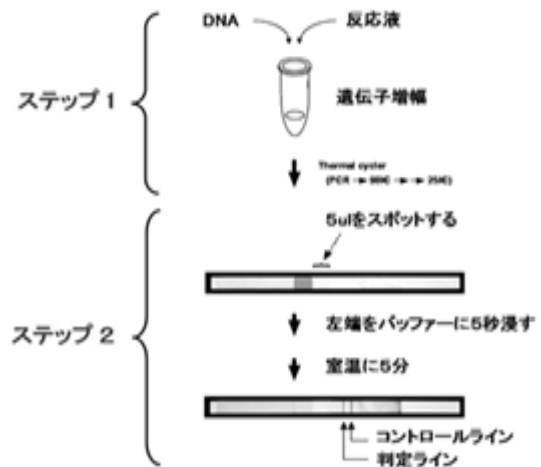


図 1 CASSOH 法の手順

実際には、変異を含む DNA 領域を PCR 反応にて増幅後、増幅産物へのビオチン標識されたオリゴヌクレオチドの結合を金粒子の標識されたアビジンにて検出する（図 2）。

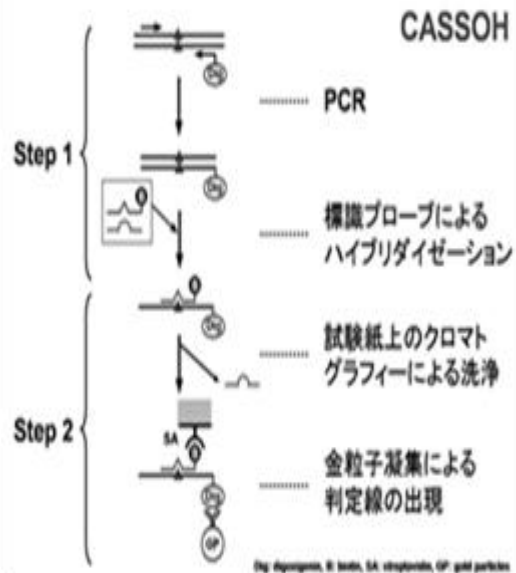


図 2 CASSOH 法の原理

## 4. 研究成果

### < 研究結果 >

日本人 MMD 患者の 70% 以上で共通な疾患感受性 MMD 遺伝子変異 p. R4856K を迅速・簡便に検出する遺伝子検査法を確立した。プロ

ブ DNA の結合の有無は、遺伝子産物を固相化出来るイムノクロマトグラフィー法を利用して検出した(図3、4に結果の例を示す)。図3にクロマトグラフィーを終えたクロマト・スティックの写真を示す。2本の矢印の上の方はクロマトグラフィーの成功を示すコントロール・ラインであり、下の矢印は検出用プローブの結合時に現れる表示ラインである。

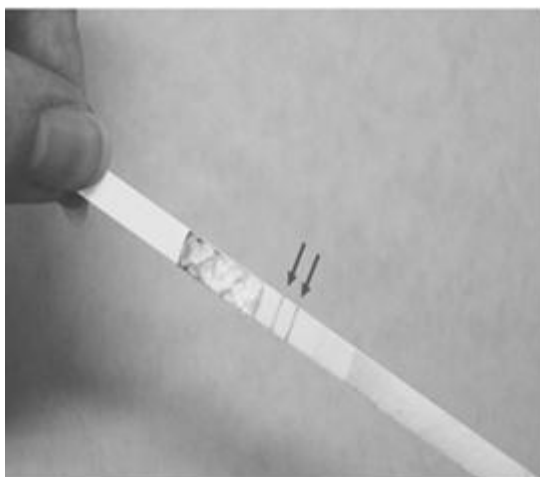


図3 イムノクロマトグラフィー後の沈降線の検出

実際の変異の検出は、野生型プローブによる反応と変異型プローブによる反応の2種類を組にして実施する。図4は2組のプローブを組にして実施した結果を示す。

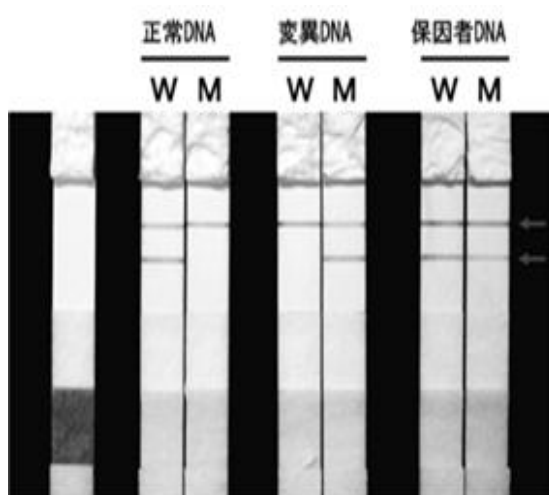


図4 CASSOH法による遺伝子検査の結果判定

正常 DNA を用いた場合、野生型プローブのクロマトグラフィー・スティックのみに表示ラインが現れ、一方変異 DNA を用いた場合、変異プローブのクロマトグラフィー・スティックのみに表示ラインが現れる。ヘテロ保因者の DNA を用いた場合、野生型と変異型の両クロマトグラフィー・スティックに表示ラインが現れる。この事により被験者の遺伝子型を検出することができる。

#### <考察>

検出プローブと競合配列を持つオリゴヌクレオチドを混合することにより、アレル特異的なハイブリダイゼーションの特異度が上がり、遺伝子型の正確な判定が可能になった。この遺伝子検出法には、PCR 以外の検査機器を必要としないため、クリニックやベッド座位度における遺伝子判定が可能になる。MMD 患者の約半数は小児である。家族に MMD 患者が存在する場合、子どもの MMD 発症のリスクは高くなるため、MMD 発症の不安が大きい。今回の研究で開発した簡便迅速な遺伝子検査遺伝子診断変を実施し、その保因者の MRA アンギオグラフィー検査を実施することで、より確度の高い MMD の発症予測が可能になることが期待できる。今後、MMD 発症に関わる新たな遺伝子が同定することにより、本遺伝子検査に新たな遺伝子型判定を加えることにより更に確度の高い発症予測が可能になると期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, M. D., Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, and Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A variant in RNF213 is the strong predictor for early-onset and severe form of Moyamoya disease. *Neurology*, (査読有) 78, 2012, 803-810. (DOI, 10.1212/WNL.0b013e318249f71f)
2. Kakisaka Y, Hino-Fukuyo N, Miyazaki H, Kure S. Infantile Tullio Phenomenon. *J Pediatr*, (査読有) 162, 2012, 880. (DOI, 10.1016/j.jpeds.2012.10.049)

3. Moriya K, Suzuki M, Watanabe Y, Takahashi T, Aoki, Y, Uchiyama T, Kumaki, S, Sasahara Y, Minegishi M, Kure S, Tsuchiya S, Sugamura K, Ishii N. Development of a multi-step leukemogenesis model of MLL-rearranged leukemia using humanized mice." PLoS One (査読有) 7:, 2012, e37892. (DOI, 10.1371/journal.pone.0037892)
4. Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Matsubara Y, Saheki T, Kobayashi K, Ohura T, Kure S. "Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in SLC25A13." Mol Genet Metab (査読有) 105, 2012, 553-558. (DOI, 10.1016/j.ymgme.2011.12.024)
5. Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL, Stanier P, Grinham J, Leung KY, Partridge D, Robinson A, Stone V, Gustavsson P, Copp AJ, Greene NDE, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects. Hum Mol Genet, (査読有) 21, 2012, 1496-1503. (DOI 10.1093/hmg/ddr585)
6. Uematsu M, Haginoya K, Kikuchi A, Nakayama T, Kakisaka Y, Numata Y, Kobayashi T, Hino-Fukuyo N, Fujiwara I, Kure S. Hypoperfusion in caudate nuclei in patients with brain-lung-thyroid syndrome. J Neurol Sci. (査読有) 315, 2012, 77-81. (DOI, 10.1016/j.jns.2011.11.025)
7. Kamada F., Aoki, Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Kanno J, Niihori, T Ono, M, Ishii N, Owada Y, Fujimura M, Mashimo Y, Suzuki Y, Hata A, Tsuchiya S, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. J Hum Genet (査読有) 56, 2011, 34-40. (DOI, 10.1038/jhg.2010.132)
8. Tsuyusaki Y, Shimbo H, Wada T, Iai M, Tsuji M, Yamashita S, Aida N, Kure S, Osaka H. Paradoxical increase in seizure frequency with valproate in nonketotic hyperglycinemia. Brain Dev. (査読有) 34, 2011, 72-75. (DOI, 10.1016/j.braindev.2011.01.005)
- )
- [学会発表] (計 8 件)
- 1 呉 繁夫「モヤモヤ病遺伝子を追う」広島先天代謝異常症治療研究会 2013年2月8日 広島
- 2 Kure S. Identification of Moyamoya disease gene, RNF213. (Invited lecture) NAVBO Workshops in Vascular Biology 2012 (Pacific Grove, CA, USA, October 14-18, 2012)
- 3 Kure S. Identification of Moyamoya disease gene and its clinical significance. GCOE (Global center of excellence) meeting. August 20, 2012, Singapore.
- 4 呉 繁夫「モヤモヤ病遺伝子を追う」特別講演 日本小児科学会秋田地方会 2012年7月21日秋田市
- 5 呉 繁夫「モヤモヤ病感受性遺伝子の同定とその臨床的意義」日本小児神経学会総会 2012年5月17-19日 札幌市
- 6 呉 繁夫「モヤモヤ病感受性遺伝子の同定とその臨床的意義」日本小児神経学会関東地方会特別講演 2012年3月17日 宇都宮
- 7 Kure S. Identification of Moyamoya disease gene. Annual meeting of American Society of Human Genetics, Montreal, Canada, October 11-15, 2011
- 8 呉 繁夫「モヤモヤ病感受性遺伝子の同定」日本小児神経学会 2011年5月26-28日 横浜
6. 研究組織  
 (1)研究代表者  
呉 繁夫 (KURE SHIGEO)  
 東北大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号：10205221
- (2)研究分担者  
 富永 悌二 (TOMINAGA TEIJI)  
 東北大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号：00217548